

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

03. 2. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 2 月 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 0 2 6 6 0 9
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 2 6 6 0 9]

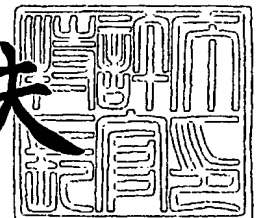
出 願 人
Applicant(s): 大塚化学株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 3 月 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 1 6 5 2 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 S20303

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 2/00

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市加賀須野 4 6 3 大塚化学株式会社研究技術センター内

【氏名】 深江 一博

【特許出願人】

【識別番号】 302060306

【氏名又は名称】 大塚化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100081536

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 巖

【電話番号】 06-6864-3137

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 020086

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脱脂卵黄から糖鎖アスパラギン誘導体を製造する方法であって、(a) 脱脂卵黄をタンパク質分解酵素により糖鎖ペプチド混合物を製造する工程、(b) 糖鎖ペプチド混合物をペプチド分解酵素により糖鎖アスパラギン混合物を製造する工程、(c) 糖鎖アスパラギン混合物中の糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入し糖鎖アスパラギン誘導体混合物を製造する工程、(d) 糖鎖アスパラギン誘導体混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、を含む糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

【請求項2】 脂溶性の保護基がFmoc基である請求項1の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

【請求項3】 (b) で得られる糖鎖アスパラギン混合物に含まれる糖鎖アスパラギンを予め加水分解して一部糖残基を切断しておく請求項1の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

【請求項4】 (c) で得られる糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を予め加水分解して一部糖残基を切断しておく請求項1の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、核酸(DNA)、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されてきている。ヒトの体は、約60兆個の細胞から成っている一大細胞社会であり、全ての細胞表面は糖鎖分子によって覆われている。例えば、ABO式血液型は細胞表面の糖鎖の違いにより決定されている。

糖鎖は、細胞間の認識や相互作用に関わる働きをもち、細胞社会を成り立たせ

る要となっている。細胞社会の乱れは、癌、慢性疾患、感染症、老化などにつながる。

例えば、細胞が癌化すると糖鎖の構造変化が起こることが分かっている。また、コレラ菌やインフルエンザウイルスなどは、ある特定の糖鎖を認識し結合することにより、細胞に侵入し感染することが知られている。

【0003】

糖鎖は単糖の配列、結合様式・部位、鎖の長さ・分岐様式、全体の高次構造などの多様性から、核酸やタンパク質の構造と比べると非常に複雑な構造である。従って、その構造に由来する生物学的な情報は核酸やタンパク質に比べて多種多様である。糖鎖は、研究の重要性を認識されながらも、その構造の複雑さや多様性により、核酸やタンパク質に比べて研究の推進が遅れている状況にある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

一方、脱脂卵黄より糖鎖アスパラギンが得られることは知られている（例えば特許文献1参照）。特許文献1によると、脱脂卵黄にアーモンドまたは杏種子を添加することにより従来よりも大量に糖鎖アスパラギンを得ている。しかし、この方法で得られる糖鎖アスパラギンは純度が95%や92%であり、純粋な糖鎖アスパラギンを単離しているとはいえない。また、収量も脱脂卵黄100kgからダイシアリルオリゴ糖（11糖ジシアリルオリゴ糖）を29.5gあるいは27.2gとなっている。

【0005】

また、鶏卵の可溶画分より抽出される糖ペプチド（SGP：シアリルグリコペプチド）より糖鎖アスパラギンが得られることも知られている。このSGPは、11個の糖残基からなる複合型糖鎖の還元末端に、アミノ酸6残基からなるペプチド鎖のアスパラギン残基が結合した化合物である。しかし、SGPは、たとえば、瀬古ら〔ビオケミカ ビオフィジカ アクタ（*Biochem. Biophys. Acta*）第1335巻、第23頁（1997）〕の方法によれば、鶏卵黄1個から約8mgしか得られないことが示されている。

〔特許文献1〕国際公開WO96/02255号公報（請求項8及び請求項10）

【0006】

本発明の課題は、医薬品開発等の分野において有用な種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の発明に係る。

1. 脱脂卵黄から糖鎖アスパラギン誘導体を製造する方法であって、(a) 脱脂卵黄をタンパク質分解酵素により糖鎖ペプチド混合物を製造する工程、(b) 糖鎖ペプチド混合物をペプチド分解酵素により糖鎖アスパラギン混合物を製造する工程、(c) 糖鎖アスパラギン混合物中の糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入し糖鎖アスパラギン誘導体混合物を製造する工程、(d) 糖鎖アスパラギン誘導体混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、を含む糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
2. 脂溶性の保護基が Fmoc 基である上記の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
3. (b) で得られる糖鎖アスパラギン混合物に含まれる糖鎖アスパラギンを予め加水分解して一部糖残基を切断しておく上記の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。
4. (c) で得られる糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を予め加水分解して一部糖残基を切断しておく上記の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、卵黄、たとえば、鳥類卵黄から得られる脱脂卵黄をタンパク質分解酵素により糖鎖ペプチド混合物を得、次にペプチド分解酵素により糖鎖アスパラギンの混合物を得、次いでこの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入（結合）して糖鎖アスパラ

ギン誘導体の混合物を得た後に当該混合物を各糖鎖アスパラギン誘導体に分離することを大きな特徴とする。なお、本明細書において、「糖鎖アスパラギン」とはアスパラギンが結合した状態の糖鎖をいう。また、「アスパラギン結合型糖鎖」とはタンパク質のポリペプチド中のアスパラギン (Asn) の酸アミノ基に、還元末端に存在する N-アセチルグルコサミンが N-グリコシド結合した糖鎖群であって、Man (β 1-4) GlcNac (β 1-4) GlcNac を母核とする糖鎖群をいう。「糖鎖アスパラギン誘導体」とはアスパラギン残基に脂溶性の保護基が結合した状態の糖鎖アスパラギンをいう。また、化合物の構造式中、「AcHN」はアセトアミド基を示す。

【0009】

本発明の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、具体的には、

- (a) 脱脂卵黄をタンパク質分解酵素により糖鎖ペプチド混合物を製造する工程、ならびに
- (b) 糖鎖ペプチド混合物をペプチド分解酵素により糖鎖アスパラギン混合物を製造する工程、ならびに
- (c) 糖鎖アスパラギン混合物中の糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入し糖鎖アスパラギン誘導体混合物を製造する工程、ならびに
- (d) 糖鎖アスパラギン誘導体混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、を含むものである。

【0010】

以下、本発明の脱脂卵黄から糖鎖アスパラギン誘導体を得る製造方法を具体的に説明する。

本発明に使用される脱脂卵黄とは、特に限定されるものではないが、例えば、鳥類の卵の卵黄（ニワトリ、ウズラ、アヒル、カモ、ハトなどの卵黄が好ましい。特に卵黄内に含まれる人型糖鎖アスパラギン、特に人型 2 分岐糖鎖アスパラギンの量からニワトリがよい。）を有機溶媒抽出することにより脱脂した後の残渣（脱脂卵黄）がよい。このとき、有機溶媒としては、メタノール、エタノール、ジエチルエーテル等が好ましい。

【0011】

(a) 工程としては、上記脱脂卵黄をタンパク質分解酵素によりタンパク質を切断し、脱脂卵黄に含まれる糖鎖ペプチド（糖鎖アスパラギンペプチド）の混合物を得る。このとき、使用するタンパク質分解酵素としては、例えば、プロナーゼ（和光純薬社製）、オリエンターゼ（HBI社製）等、一般のものを使用することができる。

また、糖鎖ペプチドの混合物より糖鎖ペプチド以外の成分を公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを用いた各種クロマトグラフィーや、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた精製法に従って除去することが好ましい。

【0012】

(b) 工程としては、(a) 工程で得られた糖鎖ペプチドの混合物をペプチド分解酵素によりペプチドを分解し、糖鎖ペプチドに含まれる糖鎖アスパラギンの混合物を得る。このとき、使用するペプチド分解酵素としては、例えば、アクチナーゼ等、一般のものを使用することができる。

また、糖鎖アスパラギンの混合物より糖鎖アスパラギン以外の成分を公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを用いた各種クロマトグラフィーや、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた精製法に従って除去することが好ましい。

また、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得るという観点から、さらに当該混合物に含まれる糖鎖アスパラギンを加水分解して一部糖残基を予め切断しておくのが好ましい。加水分解する方法としては酸を使用する方法あるいは酵素を使用する方法等がある。

【0013】

前記酸としては特に限定するものではなく、たとえば、塩酸、硫酸、硝酸、トリフルオロ酢酸などの無機酸および有機酸、陽イオン交換樹脂、不溶性の固体試薬（シリカゲル等）などを使用することができる。また、酵素としては、糖加水分解酵素が好適であり、エンド型、エキソ型いずれの反応様式の酵素も使用することができる。かかる酵素としては特に限定されるものではなく、当該活性を有

するものであれば、市販の酵素、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。

酵素反応は公知の条件に従えば良く、その際、反応の進行を薄層クロマトグラフィーで追跡し、化合物がもっとも多く得られるところで反応を適宜停止させればよい。

【0014】

(c) 工程としては、(b) 工程で得られた糖鎖アスパラギンを含む混合物を用い、それに含まれる糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基の導入を行う。当該保護基としては特に限定されるものではなく、たとえば、9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基や t-ブチルオキシカルボニル (Boc) 基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカーボネート基、アセチル基などの、カーボネート系またはアミド系の保護基などを使用することができる。得られた糖鎖アスパラギン誘導体を直ちに所望の糖ペプチドの合成に使用できるという観点から、当該保護基としては、Fmoc 基または Boc 基などが好ましく、Fmoc 基がより好ましい。Fmoc 基はシアル酸など比較的酸性条件に不安定な糖が糖鎖に存在する場合に特に有効である。また、保護基の導入は公知の方法 (たとえば、Protecting Groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照) に従って行えばよい。

たとえば、Fmoc 基を用いる場合、糖鎖アスパラギンを含む混合物に対しアセトン或いはDMFを適量加えた後、さらに9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて溶解し、25℃にてアスパラギン残基へのFmoc基の結合反応を行うことにより、当該糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基にFmoc基を導入することができる。

以上の操作により、脂溶性の保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物が得られる。

【0015】

(d) 工程としては、(c) 工程で得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物を公知のクロマトグラフィー、特に分取型のクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体に分離する。なお、かかる工程においては、得られた糖鎖アス

パラギン誘導体混合物を直接使用することができるが、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得るという観点から、さらに当該混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解に供し、一部糖残基を予め切断して得られる糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を使用してもよい。なお、糖残基の切断の程度は前記同様である。また、加水分解は前記と同様にして行うことができる。

各糖鎖アスパラギン誘導体のクロマトグラフィーによる分離は、適宜、公知のクロマトグラフィーを単独でまたは複数組み合わせる用いることにより行うことができる。

【0016】

たとえば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製後、HPLCを用いて精製する。HPLCにおいて用い得るカラムとしては逆相系のカラムが好適であり、たとえば、ODS、Phenyl系、ニトリル系や、陰イオン交換系のカラム、具体的には、たとえば、ファルマシア社製モノQカラム、イヤترون社製イアトロビーズカラムなどが利用可能である。分離条件等は適宜、公知の条件を参照して調整すればよい。以上の操作により、糖鎖アスパラギン誘導体混合物から所望の各糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

【0017】

さらに、分離された糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解することにより、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。たとえば、糖鎖アスパラギン誘導体を分離する段階においては混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体の種類を制限して糖鎖アスパラギン誘導体を大まかに分離し、次いで加水分解、たとえば、糖加水分解酵素を用いて加水分解することにより所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。なお、加水分解は前記と同様にして行うことができる。特に、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をより効率的に得る観点から、糖残基の切断様式が明確な糖加水分解酵素を用いて加水分解するのが好ましい。

このように、各糖鎖アスパラギン誘導体を得た後、さらに各種糖加水分解酵素

等を用いて当該誘導体を加水分解し、糖鎖の非還元末端の糖残基を除去することにより、たとえば、糖鎖の末端の分岐構造が不均一な様々な糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ単一化合物として得ることができる。また、種々の糖加水分解酵素を用い、加水分解する順番やその種類を変えることで、より多くの種類の糖鎖アスパラギン誘導体を製造することができる。

【0018】

また本発明は、種々の単離された糖鎖アスパラギンを大量に得ることができる糖鎖アスパラギンの製造方法を提供する。当該方法は、前記糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法に従う糖鎖アスパラギン誘導体の製造工程に続き、さらに、得られた糖鎖アスパラギン誘導体から保護基を除去する工程を含むものである。

糖鎖アスパラギン誘導体からの保護基の除去は、公知の方法に従って行うことができる（たとえば、Protecting Groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）。たとえば、保護基がFmoc基である場合、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）中、糖鎖アスパラギン誘導体にモルフォリンを加えて反応を行うことによりFmoc基を除去することができる。また、Boc基は弱酸を反応させることで除去することができる。保護基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製することにより、糖鎖アスパラギンを得てもよい。

【0019】

また、保護基がベンジル基である場合、ベンジル基の除去は、公知の方法に従って行うことができる（たとえば、Protecting Groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）。

さらに、糖鎖アスパラギンからのアスパラギン残基の除去は、公知の方法に従って行うことができる。たとえば、糖鎖アスパラギンを無水ヒドラジンと反応させた後、アセチル化することによりアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。また、糖鎖アスパラギンを塩基性水溶液で加熱還流後、アセチル化することによってもアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。アスパ

ラギン残基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製してもよい。

【0020】

このように、本発明によれば、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖（以下、3つ併せて糖鎖類という場合がある）を安価かつ効率的に大量に製造することができる。

かかる糖鎖類は医薬品開発等の分野において非常に有用である。たとえば、医薬品開発における応用例としては、たとえば、ガンのワクチン合成があげられる。細胞がガン化すると体内にはなかった糖鎖が発現することが知られている。また、当該糖鎖を化学的に合成し、ワクチンとして個体に投与すると、ガンの増殖が抑制されることも知られている。そこで、本発明により所望の糖鎖類を製造することができれば、ガンの治療に有効なワクチンの合成を行うことが可能である。また、本発明により得られる糖鎖類を、さらに化学的な反応および糖転移酵素による反応などを組み合わせて新たな糖残基を結合させて誘導体化し、新規なワクチンの合成を行うことも可能である。

【0021】

また、たとえば、糖タンパク質であるエリスロポエチン（EPO）が、その赤血球増殖能により貧血の治療薬として使われているが、このEPOは糖鎖が結合していないと活性がでないことが判明している。このように、タンパク質には糖鎖の結合によって生理活性を発現するものがあるので、たとえば、糖鎖を結合させることができない大腸菌発現系によりタンパク質のみを大量に調製し、次いで所望の糖鎖構造を有する、本発明により製造した糖鎖を導入することにより生理活性の発現を付与したり、また、任意のタンパク質に種々の糖鎖構造を有する、本発明により製造した糖鎖を導入することにより、新たな生理活性を有する新規な糖タンパク質を合成することも可能である。

【0022】

また、天然の糖タンパク質に存在する糖鎖を本発明により製造した糖鎖と置換することにより新たな生理活性を付与することも可能である。糖タンパク質が有

する糖鎖を本発明により得られた糖鎖と置換する技術としては、たとえば、P. S ears and C.H. Wong, Science, 2001, vol291, p2344 ~2350に記載の方法をあげることができる。すなわち、糖タンパク質を β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (E n d o -H) で処理してタンパク質表面のアスパラギン残基にはN-アセチルグルコサミン残基が1つだけ結合した状態にする。次いで、本発明により得られた糖鎖アスパラギン中の所望の糖鎖を β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (E n d o -M) を用いて、前記N-アセチルグルコサミン残基に結合させるという方法があげられる。また、tRNAにN-アセチルグルコサミンを結合させておいて、大腸菌などの発現系を利用してN-アセチルグルコサミン残基を有する糖タンパク質を合成後、本発明により得られた糖鎖アスパラギン中の所望の糖鎖をE n d o -Mを用いて導入することも可能である。

【0023】

また、現在、糖タンパク質を治療薬として利用する際の問題として、投与された糖タンパク質の代謝速度が速いことがあげられる。これは、糖タンパク質の糖鎖末端に存在するシアル酸が生体内で除去されると直ちに当該糖タンパク質が肝臓により代謝されることによる。そのため、ある程度の量の糖タンパク質を投与する必要がある。そこで、本発明により糖鎖の末端に除去されにくいシアル酸を新たに組み込んだ糖鎖を製造し、対象タンパク質に当該糖鎖をE n d o -Mを利用して導入すれば、生体内での糖タンパク質の代謝速度を制御することが可能となり、投与する糖タンパク質の量を低くすることも可能である。

【0024】

【実施例】

以下に実施例を挙げて説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1

エタノール (E t O H) 67 m l を攪拌しているところに、卵黄1個を割り入れる。約5時間攪拌した後ろ過を行い、さらにE t O H 30 m l で洗浄を行う。得られた結晶に、再度E t O H 83 m l を加え1晩攪拌を行った後ろ過を行いE t O H 30 m l で洗浄後、結晶を乾燥させると脱脂卵黄 (D e l i p i d

ated Egg Yolk) が約3 g得られる。このものを、りん酸緩衝液 (pH=7.0, 30 ml) に溶解させた後、NaN₃ (10 mg) を加える。さらに、オリエンターゼONS (HBI社製、1.0 g) を加え50℃で約24時間静置させる。反応の終了をTLCにて確認した後、反応液をセライトにて濾過する。濾液を濃縮により減じ、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25, 2.5×100 cm, H₂O) で精製する。目的とする糖が含まれるフラクションを集めて濃縮、次いで凍結乾燥を行う。得られた残留物 (約430 mg) に、トリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液 (pH=7.5, 43 ml)、NaN₃ (21 mg) を加え、溶解させる。このものに、アクチナーゼE (43 mg) を加え12時間おきにpHをチェックしながら24時間静置させる。24時間後、反応液に再度アクチナーゼE 21.5 mgを加え、再びpHをチェックしながら約48時間反応させる。反応の終了をTLCで確認した後、セライトろ過を行い、濾液を濃縮で減じ、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25, 2.5×100 cm, H₂O) で精製する。目的とする糖が含まれるフラクションを集めて濃縮、次いで凍結乾燥を行う。得られた残留物 (約120 mg) を、水 1.5 ml に溶かし、重炭酸ナトリウム 26 mgを加えた。ここに、Fmoc-Osu 68 mgを溶かしたジメチルホルムアミド 2.5 mlを加え、室温で2時間反応させた。原料消失をTLC (イソプロパノール: 1M酢酸アンモニウム水溶液=3:2) で確認後、エバポレーターを用いて濃縮した。残渣に、水 15 ml、ジエチルエーテル 25 mlを加えて10分間攪拌した後、分液操作を行う。さらに水層を、ジエチルエーテル 15 mlで洗浄した後、濃縮、凍結乾燥を行う。このものを、ODSカラム (ワコーゲル 100C18) を用い、グラディエントをかけ精製する。糖鎖が含まれている画分を集め、濃縮、ついで凍結乾燥を行う。この残留物をHPLC分取カラムにて精製した (YMC-Pack R&D ODS, D-ODS-5-A, 20×250 mm, AN/25 mM AcONH₄ buffer=20/80, 7.5 ml/min., wave length; 274 nm)。約15分後に出てくるメインのピークを分取後、濃縮、次いでODSカラムにて脱塩処理を行う。凍結乾燥すると、目的とするジシアロFmoc糖鎖誘導体が、約13.3 m

g得られる。

得られた化合物の ^1H -NMRデータは以下のとおりである。

【0025】

^1H -NMR (30℃)

8.01 (2H, d, $J=7.5\text{ Hz}$, Fmoc), 7.80 (2H, d, $J=7.5\text{ Hz}$, Fmoc), 7.60 (2H, dd, $J=7.5\text{ Hz}$, Fmoc), 7.53 (2H, dd, $J=7.5\text{ Hz}$, Fmoc), 5.23 (1H, s, Man4-H₁), 5.09 (1H, d, $J=9.4\text{ Hz}$, GlcNAc1-H₁), 5.04 (1H, s, Man4'-H₁), 4.86 (1H, s, Man3-H₁), 4.70~4.66 (m, GlcNAc2-H₁ GlcNAc5, 5'-H₁), 4.54 (2H, d, $J=7.9\text{ Hz}$, Gal6, 6'-H₁), 4.44 (1H, d, FmocCH), 4.34 (1H, bd, Man3-H₂), 4.29, (1H, bd, Man4'-H₂), 4.20 (1H, bd, Man4-H₂), 2.77 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3eq}), 2.80 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.62 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.14 (18H, s×6, -Ac), 1.80 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3ax})

【0026】

【発明の効果】

本発明によれば、医薬品開発等の分野において有用な種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 医薬品開発等の分野において有用な種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法を提供する。

【解決手段】 脱脂卵黄から糖鎖アスパラギン誘導体を製造する方法であって、
（a）脱脂卵黄をタンパク質分解酵素により糖鎖ペプチド混合物を製造する工程、
（b）糖鎖ペプチド混合物をペプチド分解酵素により糖鎖アスパラギン混合物を製造する工程、
（c）糖鎖アスパラギン混合物中の糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入し糖鎖アスパラギン誘導体混合物を製造する工程、
（d）糖鎖アスパラギン誘導体混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、を含む糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 2 6 6 0 9
受付番号	5 0 3 0 0 1 7 2 9 9 8
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 2 月 5 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成 15 年 2 月 4 日
-------	-----------------

次頁無

特願 2003-026609

ページ： 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[302060306]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

2002年10月15日
新規登録
大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号
大塚化学株式会社